

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan Universitas Muhammadiyah Malang dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang. Kegiatan penelitian ini dimulai pada bulan Agustus 2017 hingga November 2018.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah baskom, sendok, spatula, oven merk Hook, loyang, ayakan 80 *mesh*, *cabinet dryer*, blender, *slicer*, timbangan analitik merk Ohaus Pioneer. Sedangkan alat yang digunakan untuk analisa adalah *beaker glass*, tabung reaksi, labu Kjeldahl, *Soxhlet*, erlenmeyer, labu lemak, pendingin balik, cawan porselen, mortal, martil, desikator, oven merk WTC binder, kertas saring, laminar *air flow*, pipet ukur 1 ml, 5 ml, dan 10 ml, bola hisap, buret dan statif, tanur, sarung tangan, *vortex*, labu bakar 50 ml dan 100 ml, corong, *waterbath* Digital Thermostat Waterbath HH-4, *hot plate*, *Texture Analyzer* merk Shimadzu, neraca analitik, erlenmeyer 500 ml, pendingin tegak, labu ukur 500 ml, corong, pipet gondok 10 ml dan 25 ml, pemanas listrik, *stop watch*, gelas ukur, buret, pipet tetes.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Labu kuning utuh dan Kacang merah kering (didapatkan dari pasar Blimbing, Malang), tepung terigu protein rendah, tepung maizena, kuning telur, gula halus, mentega (didapatkan dari toko kue). Sedangkan bahan yang digunakan untuk analisa adalah aquades,

ptroleum benzene, NaOH 50%, H₂SO₄ pekat, asam borat, HCl 0,02N, asam klorida 3 %, NaOH 30 %, kertas lakmus, indikator pp, larutan *luff* (didapatkan dari Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) sederhana dengan satu faktor. Yaitu perbandingan jumlah penambahan tepung labu kuning dan tepung kacang merah. Perbandingan konsentrasi tersebut terdiri dari 7 rasio yaitu, 1:1 , 1:2 , 1:3 , 2:1, 2:3, 3:1 dan 3:2. Berdasarkan dari 7 perbandingan tersebut didapatkan ulangan sebanyak 4 kali.

Keterangan:

A1 = 1 : 1 = Tepung Labu Kuning 5,66g + Tepung Kacang Merah 5,66g
 A2 = 1 : 2 = Tepung Labu Kuning 3,8g + Tepung Kacang Merah 7,6g
 A3 = 1 : 3 = Tepung Labu Kuning 2,83g + Tepung Kacang Merah 8,4g
 A4 = 2 : 1 = Tepung Labu Kuning 7,6g + Tepung Kacang Merah 3,8g
 A5 = 2 : 3 = Tepung Labu Kuning 7,6g + Tepung Kacang Merah 8,49g
 A6 = 3 : 1 = Tepung Labu Kuning 8,49g + Tepung Kacang Merah 2,8g
 A7 = 3 : 2 = Tepung Labu Kuning 8,49g + Tepung Kacang Merah 7,6g

Tabel 1. Formulasi Biskuit Balita dengan Perlakuan Perbandingan Tepung Labu Kuning dan Tepung Kacang Merah

Nama Bahan	Perlakuan Perbandingan Tepung Labu Kuning : Tepung Kacang Merah						
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
	(1:1)	(1:2)	(1:3)	(2:1)	(2:3)	(3:1)	(3:2)
Tepung Labu Kuning	5,66	3,80	2,80	7,60	7,60	8,49	8,49
Tepung Kacang Merah	5,66	7,60	8,49	3,80	8,49	2,80	7,60
Tepung Terigu	26,42	26,42	26,42	26,42	26,42	26,42	26,42
Tepung Maizena	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89
Margarin	37,74	37,74	37,74	37,74	37,74	37,74	37,74
Gula Halus	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Kuning Telur	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55
Total	100	100	100	100	100	100	100

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tahapan yakni pembuatan tepung labu kuning dan tepung kacang merah, pembuatan biskuit balita, melakukan analisis proksimat (kadar protein, kadar air, kadar lemak dan kadar abu), analisis kadar karbohidrat, kadar serat, kadar total karoten, tekstur dan uji organoleptik (kemampuan mengunyah dan kesukaan).

3.4.1 Pembuatan Tepung Labu Kuning

Pembuatan tepung labu kuning menurut Anggrihani (2006) diawali dengan pengupasan dan pembersihan labu kuning dari bijinya. Kemudian labu kuning tersebut dicuci dengan air mengalir dan selanjutnya dipotong menggunakan *slicer* dengan ketebalan rata-rata $\pm 0,1 - 0,3$ cm. Kemudian letakkan potongan labu tersebut diatas loyang kabinet dan masukkan kedalam kabinet *dryer* dan keringkan dengan suhu 50°C selama ± 24 jam. Keluarkan labu kuning kering kemudian dihaluskan (diblender) dan diayak dengan ayakan 80 mesh. Tepung labu kuning siap digunakan.

3.4.2 Pembuatan Tepung Kacang Tanah

Pembuatan tepung kacang merah menurut Agustina (2011) adalah kacang merah dibersihkan dari kotoran (disortir) kemudian direndam. Kacang merah yang sudah direndam, dibuang air rendamannya dan direbus selama 3 menit. Setelah direbus, kacang merah ditiriskan dan didiamkan selama 2 jam. Kemudian rendam kembali kacang merha dengan air matang selama 1 malam. Setelah itu, tiriskan kacang merah dan keringkan menggunakan kanibinet *dryer*. Keluarkan dari kabinet kemudian digiling samapi halus dan diayak.

3.4.3 Pembuatan Biskuit Bayi

Pembuatan biskuit bayi menurut Nurhidayati (2011) adalah dalam proses pembuatan biskuit bayi dilakukan pengadukan bahan seperti margarin, gula halus dan kuning telur. Kemudian campurkan tepung terigu, tepung maizena, tepung labu kuning dan tepung ikan patin sampai berbentuk adonan. Cetak adonan dengan cetakan biskuit kemudian letakkan adonan tersebut diatas loyang. Panggan adonan dalam oven dengan suhu $\pm 150^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit sampai matang.

3.5 Parameter Penelitian

Parameter penelitian yang dilakukan pada tahap satu adalah analisis proksimat yang meliputi kadar protein, kadar air, kadar lemak dan kadar abu, intensitas warna yang meliputi tingkat kemerahan (a+), kecerahan (L+) dan kekuningan (b+), analisis kadar serat, kadar total karoten, fisik (tekstur), kemudian dilakukan perhitungan untuk menentukan biskuit dengan perlakuan terbaik dan dilanjutkan pada tahap kedua yaitu analisis kadar karbohidrat dan uji organoleptik (kemampuan mengunyah dan kesukaan).

3.5.1 Analisa Tahap Satu

3.5.1.1 Kadar Protein (Sukardi, 2015)

Prinsip kerja dari metode Kjeldahl adalah protein dan komponen organik dalam sampel didestruksi dengan menggunakan asam sulfat dan katalis. Hasil destruksi dinetralkan dengan menggunakan larutan alkali dan melalui destilasi. Destilat ditampung dalam larutan asam borat. Selanjutnya ion- ion borat yang terbentuk dititrasi dengan menggunakan larutan HCl. Metode kerja analisis kadar protein sebagai berikut:

1. Bahan dihaluskan dengan mortal-martil
2. Bahan ditimbang sebanyak 0,1 – 0,3 gram
3. Bahan dimasukkan kedalam labu kjedahl kemudian menambahkan 1 spatula katalisator (Na_2SO_4 4 g + HgO 0,2 g) dan 2 ml H_2SO_4
4. Sampel diletakkan ke dalam lemari asam sambil dipanaskan selama 5 jam atau hingga jernih
5. Sampel yang sudah jernih dikeluarkan dari dalam lemari asam dan tunggu hingga dingin
6. 15 ml asam borat dimasukkan kedalam erlenmeyer
7. 5 ml aquades ditambahkan ke dalam labu kjedahl kemudian sampel tersebut dituangkan ke dalam labu destilasi menggunakan corong kaca
8. 10 ml NaOH 50% dan 10 ml aquades ditambahkan kedalam labu destilasi kemudian panaskan sampel
9. Hasil destilasi (destilat) ditampung dalam erlenmeyer yang berisi 10 ml asam borat sampai asam borat berubah warna menjadi hijau tua
10. Destilat tersebut dititrasi dengan HCl 0,02 N hingga berubah warna dari hijau menjadi merah muda
11. Catat volume HCl yang digunakan
12. Kadar protein dihitung dengan rumus :

$$N \text{ total (\%)} = \frac{ml \text{ HCl} \times N \text{ HCl} \times 14,008}{Berat \text{ Bahan} \times 1000} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Protein} = N \text{ total (\%)} \times \text{faktor konversi (6,25)}$$

3.5.1.2 Kadar Air Metode Oven (AOAC, 2005)

Prinsip dari analisis kadar air metode oven adalah menguapkan molekul air bebas (H₂O) yang ada didalam bahan pada suhu dan waktu tertentu, hingga diperoleh kadar air konstan. Adapun tahapan analisis kadar air sebagai berikut:

1. Cawan porselen yang akan digunakan dikeringkan (dihomogenkan) dalam oven selama 24 jam dengan suhu 100-105°C.
2. Cawan porselen didinginkan dalam desikator selama 15 menit.
3. Berat cawan porselen ditimbang dan catat hasilnya.
4. Timbang bahan sebanyak 2 gram kedalam cawan porselen yang telah dikeringkan.
5. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 6 jam.
6. Sampel didinginkan dalam desikator selama 15 menit.
7. Sampel ditimbang sebagai berat akhir sampel.
8. Kadar air sampel ditimbang dengan rumus:

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{(\text{berat cawan} + \text{berat bahan}) - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel sebelum}} \times 100\%$$

3.5.1.3 Kadar Lemak Metode Soxhlet (Winarno, 1988)

Prinsip metode *soxhlet* ini menggunakan sampel lemak kering yang diekstraksi secara terus-menerus dalam pelarut dengan jumlah yang konstan (Darmasih 1997). Metode kerja analisa kadar lemak metode *soxhlet* adalah sebagai berikut :

1. Kertas saring ditimbang, catat beratnya kemudian dibentuk menjadi timbel
2. Timbel, labu lemak dan *soxhlet* dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50°C selama 24 jam hingga homogen

3. Timbel, labu lemak dan *soxhlet* dikeluarkan dari dalam oven dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit
4. Labu lemak ditimbang dan catat hasilnya
5. Bahan dihaluskan dan ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dimasukkan kedalam timbel
6. Sampel dimasukkan kedalam *soxhlet*
7. 10 ml Pb (petroleum benzene) dimasukkan kedalam labu lemak kemudian pasang *soxhlet* pada labu lemak
8. Sampel dipanaskan menggunakan pendingin bolak-balik pada *waterbath* dengan suhu 85°C selama 4 jam
9. Masukkan labu lemak yang telah berisi sampel lemak kedalam oven selama ± 1 jam
10. Labu lemak dikeluarkan dari dalam oven kemudian masukkan ke dalam desikator selama 15 menit hingga dingin
11. Labu lemak ditimbang dan catat hasilnya
12. Kadar lemak dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Kadar Lemak} = \frac{\text{berat akhir} - \text{berat labu awal}}{\text{berat bahan (g)}} \times 100\%$$

3.5.1.4 Kadar Abu (Winarno, 1988)

Prinsip pengabuan secara langsung yaitu cawan porselen dioven terlebih dahulu selama 1 jam kemudian diangkat dan didinginkan selama 30 menit dalam desikator. Cawan kosong ditimbang sebagai berat a gram. Setelah itu, bahan uji dimasukan sebanyak 5 gram ke dalam cawan, ditimbang dan dicatat sebagai berat b gram. Pengabuan dilakukan dalam 2 tahap, yaitu pemanasan pada suhu 300°C agar kandungan bahan volatil dan lemak terlindungi hingga kandungan asam

hilang. Pemanasan dilakukan hingga asam habis. Selanjutnya, pemanasan pada suhu bertahap hingga 600°C agar perubahan suhu secara tiba-tiba tidak menyebabkan cawan menjadi pecah. Metode kerja analisis kadar abu adalah sebagai berikut :

1. Cawan porselen yang akan digunakan dihomogenkan dalam oven selama 24 jam dengan suhu 100-105°C.
2. Cawan porselen didinginkan dalam desikator selama 15 menit.
3. Berat cawan porselen ditimbang dan catat sebagai berat cawan
4. 2 gram bahan ditimbang dan dimasukkan kedalam cawan porselen yang telah dikeringkan, dan dicatat sebagai berat bahan dalam cawan
5. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 6 jam.
6. Sampel didinginkan dalam desikator selama 15 menit.
7. Sampel dimasukkan kedalam tanur dengan suhu 600°C selama 4 jam
8. Tanur dimatikan kemudian tunggu sampai suhu turun selama 12 jam
9. Sampel dikeluarkan dari tanur dan letakkan di desikator selama 15 menit
10. Timbang sampel tersebut dan catat hasil nya sebagai berat kering
11. Kadar abu dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat kering}} \times 100\%$$

3.5.1.5 Tekstur (*Manual Texture Analyzer – TA-XTPlus*)

Prosedur pengujian daya patah analisa (*Manual Texture Analyzer – TA-XTPlus*) adalah sebagai berikut :

1. Aksesoris yang digunakan dipasang pada tempatnya

2. Sampel diukur ketebalan dan diameternya kemudian diletakkan pada meja sampel.
3. Alat dijalankan, probe akan bergerak menyentuh sampel hingga fracture, kemudian probe berhenti berderak dan kembali kesemula.
4. Komputer akan memproses data hasil pergerakan alat dan perubahanyang terjadi dalam bentuk grafik (force vs time). Puncak tertinggi menunjukkan gaya maksimum yang terukur.

3.5.1.6 Uji Serat (SNI 01-2891-1992)

Prinsip kerja analisis lemak menurut SNI adalah sampel ditimbang 2 - 5g yang telah bebas dari lemak, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 750 ml. Kemudian ditambahkan 10 ml H_2SO_4 1,25%. Dididihkan, diabukan dan dipijarkan akhirnya ditimbang sampai bobot tetap. Metode kerja analisis kadar serat gravimetri menurut SNI 01-2891-1992 adalah sebagai berikut :

1. 2 gram bahan ditimbang dan dimasukkan kedalam timbel (kertas saring pembungkus)
2. Bahan dimasukkan kedalam *soxhlet* kemudian pasang pendingin balik ke *soxhlet* dan pasang labu lemak yang sudah diisi 10 ml Pb
3. Sampel dipanaskan selama 4 jam dengan waterbath 85°C
4. Timbel dikeluarkan dari *soxhlet* dan pindahkan hasil ekstraksi yang sudah dikeringkan kedalam erlenmeyer
5. Tambahkan 200 ml larutan H_2SO_4 pekat 0,02N dan panaskan diatas *hot plate* dengan pendingin balik selama 30 menit

6. Saring larutan dengan kertas saring dan cuci dengan aquades panas yang suhunya 80 – 90 °C sampai air cucian tidak bersifat asam (diperiksa dengan indikator universal)
7. Residu dipindahkan kedalam erlenmeyer kemudian tambahkan larutan NaOH 0,2 N sebanyak 200 ml
8. Panaskan kembali menggunakan hotplate dan dengan pendingin balik selama 30 menit
9. Saring kembali dengan kertas saring
10. Residu dicuci dengan menggunakan K₂SO₄ 10% sebanyak 25 ml
11. Residu dicuci dengan menggunakan aquades panas sebanyak 15ml kemudian cuci dengan alkohol 95% sebanyak 15 ml
12. Keringkan kertas saring dan isinya (residu) di dalam oven dengan suhu 105°C sampai homogen (kering)
13. Sampel yang sudah dikeringkan diambil dan dimasukkan kedalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang berat sampel dan catat hasilnya
14. Kadar serat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar Serat} = \frac{\text{berat akhir} - \text{berat kertas}}{\text{berat bahan}} \times 100 \%$$

3.5.1.7 Uji Total Karotenoid (Kristianingrum, 2010)

Metode kerja analisis kadar total karoten adalah sebagai berikut:

1. 0,5 gram sampel ditimbang dan dimasukkan kedalam tube
2. 5 ml aseton dan 5 ml Pb (Petroleum Benzene) ditambahkan kedalam tube
3. Sentrifuse selama 10 menit lalu ambil cairan (larutan) dalam tube dan letakkan kedalam tabung reaksi. Tutup tabung dengan kapas. Lakukan sebanyak 3 kali.

4. Cuci larutan tersebut dengan aquades menggunakan corong pisah. Lakukan sebanyak 3 kali.
5. Ukur volume karoten dan catat hasilnya
6. Masukkan 1 gram Na₂SO₄ dalam tube dan tambahkan karoten kedalam tube.
7. Sentrifuse selama 5 menit.
8. Ambil cairan setelah disentrifuse kemudian masukkan ke dalam kuvet kaca dan masukkan ke dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm
9. Hitung Total Karoten dengan rumus

$$\text{Total Karoten} = \frac{\text{volume karoten} \times \text{absorbansi}}{0,2 \times \text{berat bahan}} \times 100$$

3.5.1.8 Uji Intensitas Warna dengan *Color Reader* (Sukardi, 2015)

Prinsip analisis intensitas warna dengan menggunakan *color reader* adalah melalui sistem pemaparan warna dengan menggunakan sistem CIE dengan tiga reseptor warna yaitu L+, a+, dan b+ Hunter (de Man, 1999). Adapun tahapan analisis intensitas warna menggunakan *color reader* sebagai berikut :

1. Siapkan sampel dan masukkan ke dalam plastik PP (*polypropilene*) atau plastik transparan.
2. Lepaskan penutup lensa *color reader*
3. Hidupkan *color reader* dengan menekan tombol “*POWER*”
4. Tetapkan lensa pada bahan yang akan diukur intensitas warnanya.
5. Tekan tombol disisi atas *color reader* untuk menera sampel.
6. Tenekan tombol target untuk men-nol-kan posisi *color reader* sehingga alat siap untuk mengukur sampel selanjutnya.

7. Catat nilai yang tertera pada layar digital yang meliputi L+ (kecerahan), a+ (kemerahan), dan b+ (kekuningan)
8. Matikan *color reader* dan bersihkan alat kemudian tutup kembali lensa.

1.5.2 Analisa Tahap Dua

3.5.2.1 Uji Kadar Karbohidrat Metode *Luff-Schoorl* (SNI 01-2891-1992 butir 9)

Prinsip kerja dari metode Luff-Schoorl Cu tereduksi dengan I_2 menurut SNI 01-2891-1992 butir 9 adalah hidrolisis karbohidrat menjadi monosakarida yang dapat mereduksikan Cu^{2+} menjadi Cu^{1+} . Kelebihan Cu^{2+} dapat ditatar secara Iodometri. Metode kerja uji karbohidrat menurut SNI 01-18891-1992 butir 9 adalah sebagai berikut:

1. Sampel ditimbang sebanyak kurang lebih 5g ke dalam erlenmeyer 500ml
2. Tambahkan 200ml larutan HCl 3%, didihkan selama 3 jam dengan pendingin tegak
3. Dinginkan dan netralkan dengan larutan NaOH 30% (dengan lakmus atau fenoltalein) dan tambahkan sedikit CH_3COOH 3% agar suasana larutan agak sedikit asam
4. Pindahkan isinya ke dalam kaba ukur 500ml dan himpitkan hingga tanda garis, kemudian saring
5. Pipet 10ml saringan ke dalam erlenmeyer 500ml, tambahkan 25ml larutan luff (dengan pipet) dan beberapa butir batu didih serta 15ml air suling
6. Panaskan campuran tersebut dengan nyala yang tetap. Usahakan agar larutan dapat mendidih dalam waktu 3 menit (gunakan stop watch) kemudian dengan cepat dinginkan dalam bak berisi es

7. Setelah dingin tambahkan 15ml larutan KI 20 % dan 25ml H₂SO₄ 25% perlahan-lahan
8. Titar secepatnya dengan larutan tio 0.1 N
9. Kerjakan juga blanko

Perhitungan :

$$(blanko\ penitar) \times N\ tio \times 10$$

Setara dengan terusi yang tereduksi. Kemudian lihat dalam daftar Luff-Schoorl berapa mg gula yang terkandung untuk ml tio yang digunakan

$$Kadar\ Gula = \frac{W1 \times fp}{w} \times 100$$

$$Kadar\ Karbohidrat = 0,90 \times \text{kadar glukosa}$$

Keterangan :

W = bobot sampel (mg)

W1 = glukosa yang terkandung untuk ml tio yang dipergunakan (mg)
dari daftar

fp = faktor pengenceran

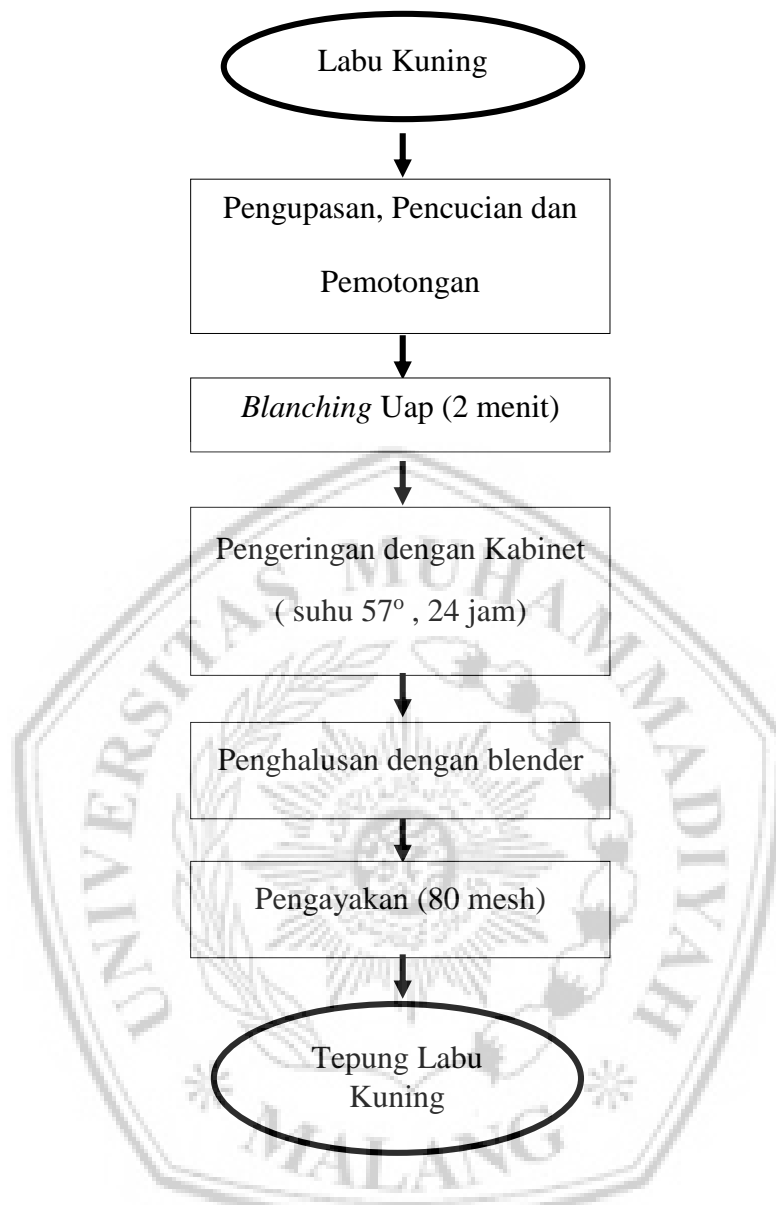
3.5.2.2 Uji Organoleptik

Manusia khususnya anak-anak merupakan panelis yang kadang-kadang dapat dipengaruhi oleh kondisi fisik dan mental, sehingga panelis dapat menjadi jenuh dan menurun kepekaannya. Dalam penelitian ini menggunakan panelis tidak terlatih yaitu balita usia 12 – 24 bulan, agar lebih mengetahui kepekaan dan kemampuan mengunyah serta kesukaan balita terhadap biskuit bayi. Sampel yang diujikan merupakan sampel dengan perlakuan terbaik saja. Panelis dibagi menjadi 3 penggolongan yaitu berdasarkan kelompok usia 12-18 bulan, kelompok jenis kelamin (laki-laki dan perempuan) dan kelompok pengujian dengan biskuit

pembandingan (komersil). Metode atau cara yang digunakan adalah dengan merekam proses pengujian organoleptik pada partisipan balita kemudian dilakukan wawancara dengan ibu kandung dari balita tersebut, kemudian menganalisis hasil rekaman tersebut untuk dilakukan skoring berdasarkan ekspresi, rekasi dan tingkah laku balita selama mengonsumsi produk biskuit balita. Selain dengan menggunakan rekaman, selama kegiatan pengujian dilakukan juga wawancara dengan ibu kandung atau kerabat dekat dari partisipan balita, guna mengetahui tentang kondisi fisik dan psikis partisipan balita ketika melakukan pengujian organoleptik biskuit balita.

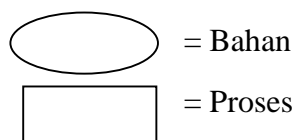
Tabel 2. Penilaian Organoleptik Biskuit Balita Substitusi Tepung Labu Kuning dan Tepung Kacang Merah

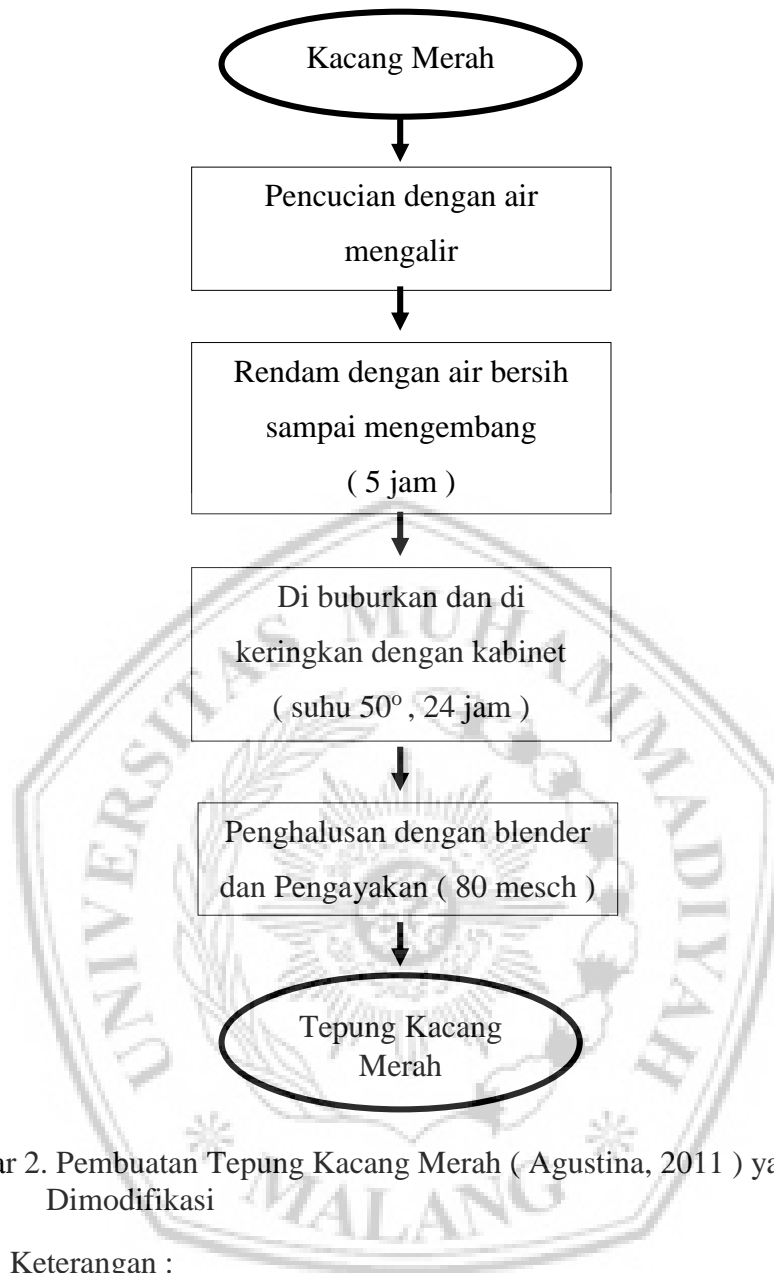
Skor	Kemampuan Mengunyah (Melumat)	Kesukaan
1	Sangat Sulit	Sangat Tidak Suka
2	Cukup Sulit	Tidak Suka
3	Sulit	Cukup Suka
4	Agak Mudah	Suka
5	Mudah	Sangat Suka



Gambar 1. Pembuatan Tepung Labu kuning (Anggrahini, 2006) yang Telah Dimodifikasi

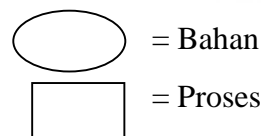
Keterangan :

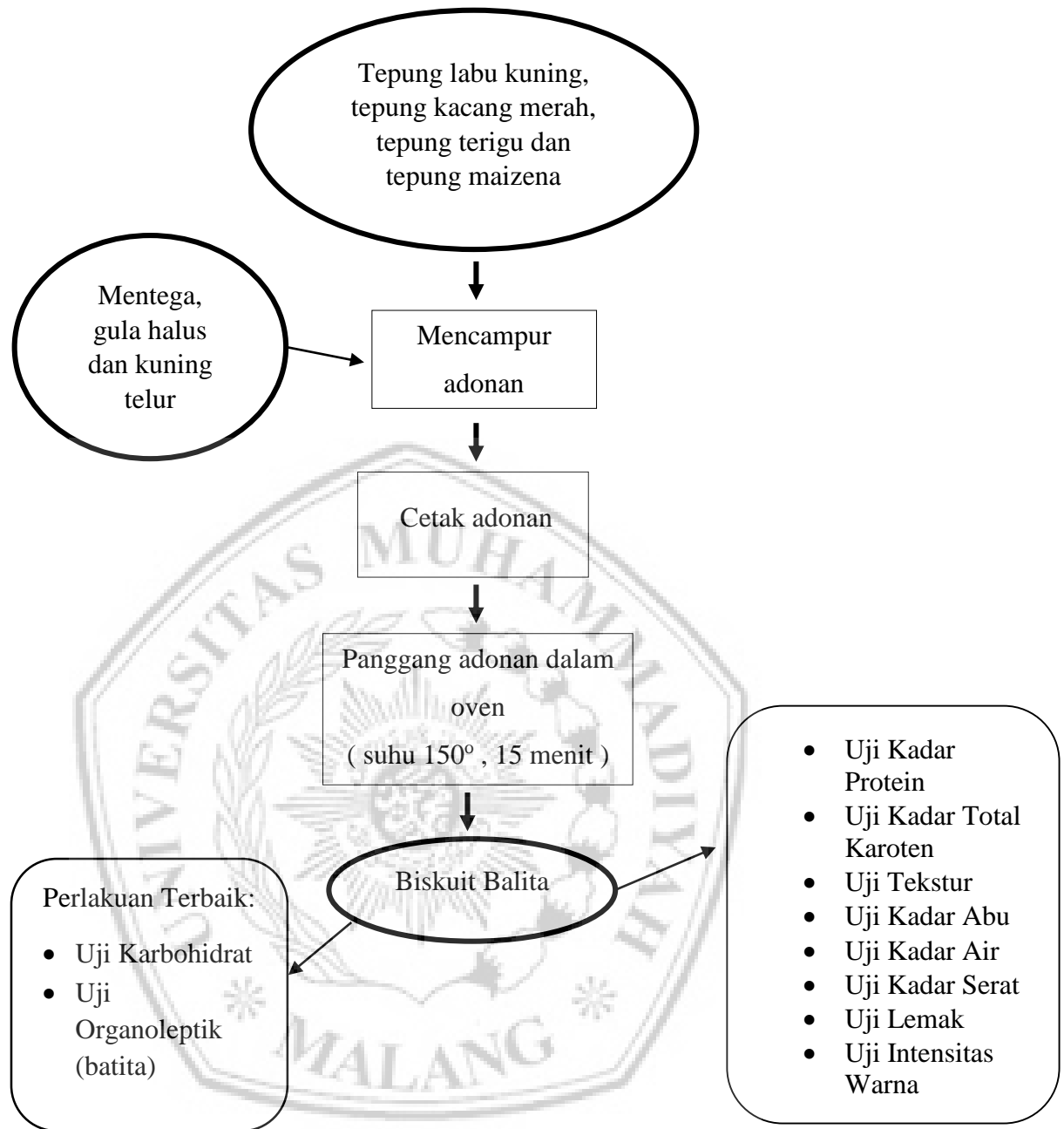




Gambar 2. Pembuatan Tepung Kacang Merah (Agustina, 2011) yang Telah Dimodifikasi

Keterangan :





Gambar 3. Pembuatan Biskuit Balita (Nurhidayati, 2011) yang Telah Dimodifikasi

Keterangan :

